

EBV形質転換法によるヒト抗i単クローン抗体の作製 とこれを用いたB細胞表面糖脂質の解析

| | |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------------|
| 著者 | 長塚 靖子 |
| 号 | 2919 |
| 発行年 | 1996 |
| URL | http://hdl.handle.net/10097/21476 |

| | | | | |
|-------------|-----------------------------------------------------------|---------|---------|--------|
| 氏 名（本籍） | なが 長 | つか 塚 | やす 靖 | こ 子 |
| 学 位 の 種 類 | 博 士 （ 医 学 ） | | | |
| 学 位 記 番 号 | 医 第 2 9 1 9 号 | | | |
| 学位授与年月日 | 平 成 8 年 9 月 11 日 | | | |
| 学位授与の条件 | 学位規則第 4 条第 2 項該当 | | | |
| 最 終 学 歴 | 昭 和 51 年 7 月 15 日 東北大学大学院農学研究科博士後期課程 （農芸化学専攻）単位修得退学 | | | |
| 学 位 論 文 題 目 | EBV 形質転換法によるヒト抗 i 単クローン抗体 の作製とこれを用いた B 細胞表面糖脂質の解析 | | | |
| | (主 査) | | | |
| 論文審査委員 | 教授 | 菅 村 和 夫 | 教授 | 佐々木 毅 |
| | | 教授 | 佐 竹 正 延 | |

論文内容要旨

私は EBV 形質転換法によるヒト単クローン抗体作製の可能性を追求する目的で EBV 形質転換細胞株をオリゴクローンの形で集積したライブラリーを作製し、これらの細胞株の培養上清がどんな範囲の抗原と反応するのかを検索してきた。この過程で私は分化抗原の一つとして血液型物質の一つである i 型活性糖脂質 (NeuAc-Gal-GlcNAc-Gal-GlcNAc-Gal-Glc-Cer) に着目し、細胞分化に関わる糖脂質の解析を目的としてヒト型抗 i 単クローン抗体 GL-1, GL-2 を作製し、これを用いてヒト B 細胞糖脂質の動態を解析した。

得られた細胞株はいずれも IgM クラスのイムノグロブリンを産生し、ヒト臍帯赤血球及び成人 i 型血球 (Ai, Oi) を寒冷凝集したが成人赤血球 (AI, BI 及び OI 型), ヒツジ, ウサギ, ウマ及びウシ赤血球に対しては凝集活性を示さなかった。また、常温ではいずれの赤血球も凝集しなかった。すなわち、得られた単クローン抗体は両者とも i 特異的単クローン性寒冷凝集素と考えられた。

これらの抗体を用いて血球由来細胞株 23 株を標的として本抗体を介した補体依存性細胞傷害試験を行ったところ、EBV 陰性 B 細胞株 BJA-B, Ramos が強い感受性を示した。B 細胞株の中で抵抗性を示したものはすべて EBV 陽性だった。本抗体に対する感受性と EBV 保持の有無との間に逆の相関が認められたので BJA-B, Ramos の EBV 陽性転換株 BJA-B/B95-8, BJA-B/HR-1, Ramos/B95-8 及び Ramos/HR-1 をその親株と比較したところ、EBV 陰性の親株は感受性を示すのに対し、EBV 陽性転換株では抵抗性を示し、EBV によって本抗体に対する感受性が変化することが示唆された。補体蛍光抗体法及び ¹²⁵I 標識抗体による飽和結合試験により各細胞株における抗体の表面結合量を比較検討したところ、BJA-B で 700-1500 ; Ramos で 2400-3500 分子の GL-1 抗体が結合するが、EBV 陽性転換株 BJA-B/B95-8, BJA-B/HR-1 ; Ramos/B95-8, Ramos/HR-1 ではいずれの株においても特異的な結合は観察されなかった。更にそれぞれの細胞株からフェニルボロネートアガロースカラムを用いて粗糖脂質画分を調製し、TLC-イムノステイニングにより抗原物質の検索を行ったところ、BJA-B, Ramos で i 型活性糖脂質及びそのアシアロ体とは異なる移動度をもつ抗体反応性スポットを検出した。EBV 陽性転換株ではこのスポットは検出されないかごく薄かった。この抗原は糖脂質のオリゴ糖とセラミドの結合を切断するエンドグリコセラミダーゼによって消失することから糖脂質と考えられた。このような糖脂質の変化が EBV 感染に伴うものなのかどうかを確かめる目的で Ramos に B95-8 由来の EBV を新たに感染させ、単クローン抗体 GL-1 と補体で処理し、抗原陽性細胞を損傷したところ、生き残った細胞は全て EBNA 陽性となっていた。同様な選択は BJA-B に P3HR-1 由来の

EBV を感染させた際にも認められた。更に抗原陽性の BJA-B 細胞を本抗体存在下で培養すると増殖の促進がみられ、また本抗体で刺激するとチロシンキナーゼの活性化が起こり、タンパクチロシンリン酸化がみられた。すなわち本糖脂質抗原を介した刺激はチロシンリン酸化を介する増殖シグナルを生起していることが示された。本抗体の脾帯血球および B 細胞上で認識している抗原は極微量の 9-O-アセチル化ガングリオシドと考えられた。

本研究は EBV 感染によってシアル酸の修飾状態が変化することを示したはじめての例である。また、極微量の修飾されたシアル酸を含むガングリオシドが B 細胞の増殖調節に関わっていることを示した。本研究では自ら作製した単クローン抗体を用い、独自の細胞系を解析した。

審 査 結 果 の 要 旨

本論文の著者は EBV 形質転換法によるヒト単クローン抗体作製の可能性を追求する目的で、EBV 形質転換細胞株のオリゴクローンライブラリーを作製し、抗体の分布を調べていた。この過程で、著者は分化抗原の一つとして胎児性の血液型物質の一つである i 型活性糖脂質 (NeuAc-Gal-GlcNAc-Gal-GlcNAc-Gal-Glc-Cer) に着目し、細胞分化に関わる糖脂質の解析を目的として上記オリゴクローンライブラリーからヒト型抗 i 単クローン抗体 GL-1, GL-2 を作製した。

本論文ではこれらの抗体を用いてまず補体依存性細胞傷害試験を行い、EBV 陰性 B 細胞株 BJA-B, Ramos が感受性を示すことを見いだした。さらにこれらの細胞株の EBV 陽性転換株 BJA-B/B95-8, BJA-B/HR-1, Ramos/B95-8 及び Ramos/HR-1 をその親株と比較し、EBV によって本抗体に対する感受性が変化することを示した。補体蛍光抗体法及び ^{125}I 標識抗体による飽和結合試験により各細胞株における抗体の表面結合量を比較検討し、BJA-B で 700–1500 ; Ramos で 2400–3500 分子の GL-1 抗体が結合するが、EBV 陽性転換株ではいずれの株においても特異的な結合を検出しないことを確認している。更にそれぞれの細胞株から粗糖脂質画分を調整し、TLC-イムノステイニングにより抗原物質の検索を行って、BJA-B, Ramos で i 型活性糖脂質及びそのアシアロ体とは異なる移動度をもつ抗体反応性スポットを検出した。著者は、本抗原はアルカリ感受性、C 型インフルエンザウイルスのノイラミン酸 9-0-アセチルエステラーゼ感受性から極微量の構造未知の 9-0-アセチル化ガングリオシドと考えている。おそらくこれは新しいガングリオシドと考えられる。このような糖脂質の変化が EBV 感染に伴うものなのかどうかを確かめる目的で Ramos, BJA-B に B95-8 および P3HR-1 由来 EBV を新たに感染させ、単クローン抗体 GL-1 と補体で処理し、抗原陽性細胞を損傷したところ、EBV 陽性ポピュレーションをセレクトすることができた。更に著者は本抗原の生物学的機能を明らかにするためのいくつかの実験を行い、本抗原が細胞周期の G2M 期に関連して発現していて、本抗原密度の増加が細胞分裂の引き金の一つとなる可能性、また本抗体で刺激するとチロシンキナーゼの活性化とタンパクチロシンリン酸化がみられ、本糖脂質抗原を介した刺激はチロシンリン酸化を介する増殖シグナルを生起している可能性を示した。

ウイルス感染が細胞成分の変化を誘導し、いわゆる感染症のみならず免疫病を含めた種々の病態を起こしうるとされ、その詳細な解明が求められてきた。本研究は EB ウイルス感染により糖脂質の変化をもたらすことを明らかにした初めての研究である。ここにおける実験系の構築、解明のアプローチは独自のものでもある。本論文は学位論文としての価値あるものと見なされる。